

N° d'Enregistrement

au C.N.R.S.

A. O. 7045

Article principal recouvrant en partie

la THÈSE présentée

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS VI

par

M. Jean-Pierre JOUANNEAU

Sujet de la Thèse :

**Contribution à l'étude du rôle moléculaire des cytokinines
dans le contrôle de la mitose chez les cellules de Tabac**

Soutenue le

1971

devant la Commission d'Examen composée de :

MM. P. CHOUARD

Président

J. GUERN

C. PÉAUD-LENOËL

F. GROS

} Examinateurs

N° d'Enregistrement

au C.N.R.S.

A. O. 7045

Article principal recouvrant en partie

la THÈSE présentée

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS VI

par

M. Jean-Pierre JOUANNEAU

Sujet de la Thèse :

**Contribution à l'étude du rôle moléculaire des cytokinines
dans le contrôle de la mitose chez les cellules de Tabac**

Soutenue le

devant la Commission d'Examen composée de :

MM. P. CHOUARD

Président

J. GUERN

C. PÉAUD-LENOËL

F. GROS

} *Examineurs*



CONTRÔLE PAR LES CYTOKININES DE LA SYNCHRONISATION DES MITOSES DANS LES CELLULES DE TABAC

J. P. JOUANNEAU

*Laboratoire de Photosynthèse, Centre National de la Recherche Scientifique,
91, Gif-sur-Yvette, France*

SUMMARY

It is known that one of the requirements for growth of Tobacco cell suspensions is the presence of a cytokinin in the culture medium. Mitosis can be partially synchronized by a temporary lack of cytokinin and its later addition to the medium after a suitable lag period. Several waves of the mitotic index were observed and during each of them 80 to 100 % of the cells divided. The addition of an auxin factor was a prerequisite for the occurrence of mitosis but the temporary lack of this factor had no synchronizing effect. The better synchronizing situation was obtained when auxin was added 25 h and cytokinin 30 to 35 h after the transfer of the cells to a new basal medium. The ratio of maximum to minimum mitotic index was about 8.5 using a clonal Tobacco cell culture.

A model of this synchronizing effect of cytokinins is proposed in which, in the absence of this factor, most of the cells accumulate behind a metabolic block in the mitotic cycle. When cytokinin is later added the block is released and synchronous mitosis are observed.

La division des cellules de Tabac exige la présence simultanée d'un facteur auxinique et d'une cytokinine [5]. On ignore cependant quels sont les événements que détermine spécifiquement l'addition de ces facteurs et qui ont pour conséquence la division cellulaire. Une des premières questions que l'on peut se poser concerne le degré de spécificité des contrôles exercés par les facteurs de croissance. Si nous supposons que la mitose est commandée par une séquence déterminée d'événements métaboliques, on peut concevoir qu'un facteur de croissance donné soit un effecteur spécifique d'une étape de cette séquence que nous désignerons sous le nom de cycle mitotique.

Lorsque des cellules placées dans des conditions compatibles avec la croissance, subissent une perturbation physique ou chimique

qui bloque d'une manière prépondérante l'une des étapes du cycle mitotique, elles sont amenées à se regrouper dans un état défini antérieur au blocage ainsi déterminé. Si l'inhibition est levée, les cellules se divisent d'une manière synchrone. La synchronisation de la division de cellules végétales a été ainsi obtenue [3, 7]. Le fait que les cellules de Tabac exigent une auxine et une cytokinine peut être mis à profit pour tenter de synchroniser leurs divisions. Si l'un de ces deux facteurs intervient spécifiquement dans le cycle mitotique, la culture des cellules dans du milieu carencé uniquement en ce facteur, doit les amener à toutes se regrouper dans une phase déterminée du cycle. L'addition de ce facteur doit alors entraîner la division synchrone des cellules.

On verra que cette technique ne permet

Tableau 1. Concentrations des facteurs de croissance utilisées pour la culture des suspensions cellulaires de Tabac

Lignée cellulaire	Conditions d'entretien des souches-mères		Conditions de croissance optimale	
	2,4-D (μ M)	Kinétine (μ M)	2,4-D (μ M)	Kinétine (μ M)
II	0,37	0,037	0,37	0,25
II 19	0,20	0,062	0,20	0,50

Abréviations :

2,4-D, Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (Serlabo, Paris) (2 fois recristallisé).

Kinétine, N⁶-furfuryladénine (N.B.C., Cleveland, Ohio) (2 fois recristallisée).

pas d'obtenir les meilleures conditions pour la synchronisation des mitoses mais fournit des informations nouvelles sur l'effet spécifique des cytokinines.

Certains des résultats présentés ont fait l'objet d'une publication préliminaire [6].

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique

Ce travail est réalisé à l'aide de suspensions cellulaires provenant initialement de moelle de Tabac (*Nicotiana tabacum* var. Wisconsin 38) entretenues en milieu liquide agité (lignée II) [5]. Certaines expériences sont effectuées avec une lignée clonale (lignée II 19) isolée à partir de la lignée initiale II [11].

Conditions de culture

Les conditions de culture ont été précédemment décrites [4, 5]. Pour la lignée II 19 le milieu contient de l'hydrolysate de caséine sans vitamines (100 mg/l). Les deux lignées cellulaires sont entretenues par repiquage de 25 ml de suspension en phase stationnaire dans 400 ml de milieu neuf. Les concentrations de facteurs de croissance utilisées pour l'entretien des souches-mères sont indiquées dans le tableau 1.

La croissance est exponentielle dans la période du 3^{ème} au 8^{ème} jour après l'ensemencement. La phase stationnaire est atteinte après 11 jours et, à ce moment, l'index mitotique dans les cultures est nul. On a vérifié que seul l'épuisement du saccharose du milieu est responsable de l'arrêt de la division cellulaire et que les autres constituants du milieu, notamment les facteurs de croissance, ne sont pas limitants.

Pour les expériences, on utilise des suspensions de groupes cellulaires provenant de souches-mères récoltées en général au début de la phase stationnaire au terme d'une culture de 11 jours. Les groupes cellulaires sont calibrés par filtration des souches-mères sur des tamis de nylon de vide de maille de 350 μ , séparés du milieu épuisé, lavés et repris dans du milieu neuf (milieu de base) à la concentration de 25 000 à 30 000 cellules par ml. Dans une telle suspension, 90 % environ des cellules appartiennent à des groupes comportant moins de 25 cellules. Le milieu de base est ensuite complété par l'addition du facteur auxinique et de la cytokinine selon des séquences variées qui seront précisées dans la partie expérimentale. On utilise les facteurs de croissance aux concentrations qui permettent la croissance optimale (tableau 1).

Mesure de l'index mitotique

Le taux de multiplication cellulaire dans les cultures est mesuré par l'index mitotique:

$$IM = \frac{\text{Nombre de noyaux en division}}{\text{Nombre total de noyaux observés}} \times 100$$

Les valeurs de IM sont calculées après observation de 2 000 noyaux.

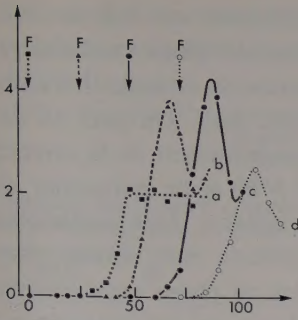
Les massifs cellulaires de 2 ml de suspension sont séparés du milieu par centrifugation, fixés pendant 10 à 15 min dans du fixateur de Carnoy [9] puis rincés par de l'éthanol à 70 % (v/v). Le culot est coloré par du carmin acétique [9] pendant 3 min au bain marie à 90°C. Le culot est rincé deux fois par de l'acide acétique à 45 % (v/v) et remis en suspension dans 0,2 à 0,5 ml d'eau. Les massifs cellulaires colorés sont observés au microscope ($\times 500$) après écrasement entre lame et lamelle.

RESULTATS

Mise en évidence de la synchronisation des mitoses

On a recherché en premier lieu si la carence momentanée en facteurs de croissance pouvait induire la synchronisation des mitoses.

Une suspension cellulaire est ensemencée dans du milieu carencé en facteurs de croissance. Le 2,4-D et la kinétine sont ajoutés simultanément à concentration optimale soit au début de l'expérience, soit après des périodes variables d'incubation en milieu carencé (fig. 1). Lorsque les cellules sont placées immédiatement en milieu complet (fig. 1, courbe a), la croissance débute après une période de latence de 25 à 30 h



Figs 1, 2. Abscisses: heures; ordonnées: IM.

Influence d'une période de préculture en milieu limitant en facteurs de croissance sur l'évolution de l'index mitotique. Une suspension de cellules de la lignée II est préparée à partir d'une souche-mère en phase stationnaire comme il est indiqué dans le chapitre méthodologique. Cette suspension est ensemencée dans du milieu neuf contenant les facteurs de croissance à des concentrations limitantes ne permettant pas la multiplication cellulaire [5]: 2,4-D = 1,5 nM; kinétine = 1 nM. Ces facteurs sont ajoutés simultanément à concentration optimale (tableau 1) au temps zéro de l'expérience (courbe *a*) ou après des périodes d'incubation en milieu carencé de 24 h (courbe *b*), 48 h (courbe *c*) ou 72 h (courbe *d*). Les additions des facteurs sont indiquées par le symbole *F*.

puis l'index mitotique augmente jusqu'à atteindre une valeur constante, à l'erreur statistique près: les mitoses sont uniformément réparties dans le temps. Si une période de préculture de 24 h en milieu carencé précède l'addition des facteurs de croissance (fig. 1, courbe *b*) les premières mitoses sont observées 18 h environ après cette addition. L'index mitotique passe par une valeur maximum 20 h après le début de la croissance puis décroît ensuite pour atteindre une valeur minimum 10 à 15 h plus tard. Il y a donc une synchronisation partielle de la division nucléaire. Ce phénomène s'observe aussi si la durée de la préculture est de 48 h (fig. 1, courbe *c*) ou de 72 h (fig. 1, courbe *d*). Cependant dans ce dernier cas, on note une réduction de l'index mitotique maximum et de l'amplitude de la synchronisation. D'autre part, on constate que la préculture en milieu carencé diminue la durée de la période de

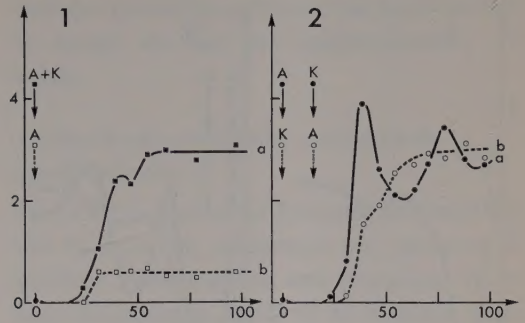


Fig. 2. Coordonnées: voir fig. 1.

Evolution de l'index mitotique en fonction de l'ordre des additions des facteurs de croissance. Les cellules proviennent de la lignée clonale II 19 récoltée en fin de croissance. Les additions de 2,4-D et de kinétine effectuées à concentration optimale (tableau 1) sont respectivement indiquées par les symboles *A* et *K*. 1: courbe *a*: le 2,4-D et la kinétine sont ajoutés simultanément au début de l'expérience (*A+K*); courbe *b*: le 2,4-D est ajouté seul (*A*). 2: Les facteurs sont ajoutés séparément: courbe *a*: additions de 2,4-D (*A*) au début de l'expérience et de kinétine (*K*) 15 h plus tard; courbe *b*: ordre inverse de celui de la courbe *a*.

latence qui sépare l'addition des facteurs de croissance de l'apparition des premières mitoses.

Dans l'expérience de la fig. 1, les mesures sont limitées à la durée du premier pic de synchronisation. Si l'on poursuit l'expérience, on observe trois vagues mitotiques successives et d'amplitude décroissante puis l'index mitotique devient constant [6].

Recherche du facteur responsable de la synchronisation

On peut se demander si la carence simultanée en 2,4-D et en kinétine est nécessaire pour induire la synchronisation des mitoses ou si l'absence momentanée d'un de ces deux facteurs seulement est responsable de ce phénomène.

La courbe *a* de la fig. 2-1 représente l'évolution de l'index mitotique dans une culture de cellules de la lignée clonale II 19 lorsque les facteurs de croissance sont ajoutés

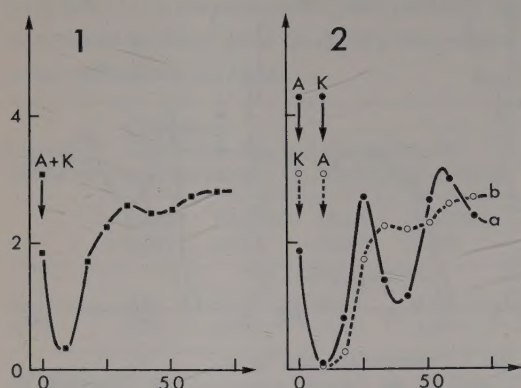


Fig. 3. Coordonnées: voir fig. 1.

Effet de l'ordre des additions des facteurs de croissance sur l'index mitotique de suspensions cellulaires ensemencées en phase exponentielle de croissance. Les cellules de la lignée II 19 sont récoltées à partir d'une souche-mère en croissance exponentielle âgée de 6 jours. Les autres conditions expérimentales sont identiques à celles de la fig. 2.

simultanément au début de l'expérience. L'index mitotique présente des fluctuations limitées qui ne sont pas observées avec la lignée II non clonée cultivée dans les mêmes conditions expérimentales (fig. 1, courbe *a*). Cependant, la forme générale de la courbe est similaire et reflète l'apparition pratiquement asynchrone des mitoses dans la culture. Cette lignée clonale cultivée en l'absence de kinétine (fig. 2-1, courbe *b*) présente un index mitotique constant égal à environ 20 % de celui obtenu en milieu complet.

Lorsque le 2,4-D est ajouté dès la mise en culture des cellules et la kinétine après un délai de 15 h (fig. 2-2, courbe *a*), les mitoses sont partiellement synchrones. Si, au contraire, c'est l'addition du 2,4-D qui est retardée on obtient une courbe d'asynchronie (fig. 2-2, courbe *b*) comme à la suite de l'addition simultanée des facteurs de croissance au début de l'expérience (fig. 2-1, courbe *a*). Ces deux courbes ne sont cependant pas superposées: l'addition différée du 2,4-D (fig. 2-2, courbe *b*) retarde l'apparition des mitoses.

L'expérience précédente est réalisée avec des cellules récoltées en phase stationnaire, carencées en saccharose au moment de l'ensemencement en milieu neuf. On peut se demander si l'effet synchronisant de la carence en kinétine est lié à ce stade particulier de la croissance des cellules. Une expérience analogue à la précédente mais réalisée avec des cellules récoltées en phase exponentielle de croissance (fig. 3) permet de constater que la carence en kinétine entraîne encore, à elle seule, la synchronisation partielle des mitoses (fig. 3-2, courbe *a*).

Au cours des expériences précédentes, on a observé que si l'on introduit un délai dans l'addition du 2,4-D (fig. 2-2, courbe *b*; fig. 3-2, courbe *b*), l'apparition des mitoses dans la culture est différée. Il a donc semblé intéressant de rechercher dans quelle mesure l'addition du 2,4-D contrôle la cinétique de la division cellulaire.

Des cellules sont mises en culture pendant 30 h dans du milieu carencé en facteurs de croissance puis on ajoute, soit le 2,4-D et la kinétine simultanément, soit l'un seulement de ces deux facteurs; dans ce dernier cas, le facteur complémentaire est ajouté 10 h plus tard (tableau 2). En accord avec les résultats du paragraphe précédent, le fait que les cellules aient subi une préculture en milieu carencé entraîne la synchronisation des mitoses quelle que soit la séquence de l'addition des facteurs de croissance. Dans l'expérience no. 3 du tableau 2, le 2,4-D est fourni aux cellules 10 heures plus tard que dans les expériences no. 1 et 2. Les durées d'expérience après lesquelles on observe le début de la croissance (t_c) et le sommet du pic de synchronisation (t_{max}) sont prolongées de 9 h environ par rapport aux expériences no. 1 et 2. Cependant, le délai d'apparition des mitoses (Δt_c) et la durée nécessaire pour atteindre le sommet de la vague mitotique (Δt_{max}) sont sensiblement constants si on

Tableau 2. Constantes cinétiques de la division cellulaire en fonction du moment de l'addition du 2,4-D

Addition des facteurs de croissance après :		Horaire par rapport au début de l'expérience (heures)		Délais par rapport à l'addition de 2,4-D (heures)	
30 h	40 h	t_c	t_{max}	Δt_c	Δt_{max}
1 2,4-D + K		45	66	15	36
2 2,4-D	K	45	68	15	38
3 K	2,4-D	54	77	14	37

La préparation de la suspension cellulaire est identique à celle décrite dans la légende de la fig. 1.

Les cellules subissent une incubation de 30 h en milieu limitant en facteurs de croissance puis :

- 1 : on ajoute simultanément le 2,4-D et la kinétine à concentration optimale.
- 2 : on ajoute le 2,4-D puis, 10 h plus tard, la kinétine.
- 3 : les additions de 2,4-D et de kinétine sont effectuées dans l'ordre inverse de celui de l'expérience 2.

t_c , Début de la croissance noté lorsque l'index mitotique atteint 0,1 %.
 t_{max} , Position dans le temps du sommet de la vague mitotique.
 Δt_c , Délai d'apparition des mitoses séparant l'addition du 2,4-D du moment t_c .
 Δt_{max} , Délai séparant l'addition du 2,4-D du moment t_{max} .

les mesure à partir du moment de l'addition du 2,4-D (tableau 2). Dans les limites de cette expérience, la position dans le temps de la vague mitotique est donc commandée par l'addition du facteur auxinique.

Les expériences qui viennent d'être décrites permettent les conclusions suivantes:

(1) La carence momentanée en cytokinine seule suffit à produire une synchronisation partielle des mitoses. Au contraire, le délai d'addition du facteur auxinique seul n'exerce pas d'effet synchronisant.

(2) Dans les limites de temps des expériences, le moment de l'addition du facteur auxinique détermine le moment de l'appari-

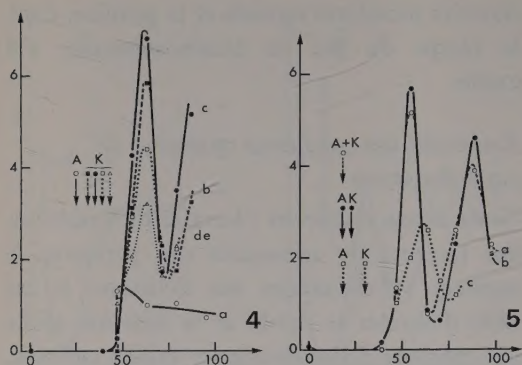
tion des premières mitoses et la position dans le temps du pic de synchronisation, s'il existe.

Recherche des conditions optimales de synchronisation

Nous avons recherché l'horaire de l'addition des facteurs de croissance qui permette le meilleur synchronisme des divisions. Il est utile d'ajouter le 2,4-D et la kinétine après une période d'incubation en milieu carencé, ce qui entraîne une réduction de la période de latence entre leur addition et le début de la croissance (fig. 1). D'autre part, la synchronisation apparaissant après une carence en cytokinine, on peut espérer l'améliorer en augmentant le délai qui sépare l'addition du 2,4-D de celle de la kinétine.

Dans l'expérience de la fig. 4, les cellules subissent une préculture de 25 h, puis on ajoute le 2,4-D soit seul (fig. 4, courbe *a*), soit suivi de l'addition de kinétine après une période supplémentaire de durée variable (fig. 4, courbes *b*, *c*, *d*, *e*). Dans toutes ces conditions, les premières mitoses apparaissent 20 à 22 h après l'addition de 2,4-D. Lorsque l'on a ajouté de la kinétine, on observe un pic de synchronisation dont le sommet se situe 16 à 17 h après le début de la croissance. Cependant, les résultats varient quantitativement selon la durée de la carence en kinétine: la synchronisation est améliorée jusqu'à un optimum qui correspond à un délai de 10 h entre les additions de 2,4-D et de kinétine (fig. 4, courbe *c*); si la carence en kinétine est prolongée au-delà de 10 h (fig. 4, courbes *d* et *e*), on constate une diminution de l'index mitotique moyen et de la synchronisation jusqu'à obtenir la courbe témoin en présence de 2,4-D seul (fig. 4, courbe *a*). Dans ce dernier cas, l'index mitotique se stabilise à environ 25 % de l'index mitotique moyen mesuré en milieu complet.

A la suite de l'addition simultanée de 2,4-D



Figs 4, 5. Coordonnées: voir fig. 1.

Fig. 4. Étude de la synchronisation des mitoses en fonction du délai séparant l'addition de 2,4-D de celle de la kinétine. Cette expérience est réalisée avec des cellules de la lignée II. Les suspensions sont cultivées pendant 25 h dans du milieu dépourvu de facteurs de croissance puis on ajoute le 2,4-D (A). La culture témoin ne reçoit pas de kinétine: courbe a. Dans les autres conditions, l'addition de kinétine (K) est effectuée après une culture supplémentaire de 6 h (courbe b), 10 h (c), 14 h (d), 18 h (e). Fig. 5. Synchronisation des mitoses chez la lignée clonale II 19. Les conditions de préparation des cultures sont identiques à celles de la fig. 2. Le 2,4-D (A) est ajouté au terme d'une préculture de 18 h en milieu dépourvu de facteurs de croissance. L'addition de kinétine (K) est effectuée soit simultanément (courbe a), soit après un délai supplémentaire de 5 h (courbe b) ou de 12 h (courbe c).

et de kinétine après une période de préculture en milieu carencé (fig. 1, courbe b), le rapport de l'index mitotique maximum à l'index mitotique minimum (IM max/IM min) est voisin de 2. Il atteint 3,9 environ dans les conditions optimales (fig. 4, courbe c).

Le caractère partiel de la synchronisation optimale pouvait s'expliquer par une hétérogénéité de réponse des cellules de la lignée II aux facteurs de croissance. Dans ce cas, on devait s'attendre à améliorer les rendements de synchronisation en utilisant des lignées clonales.

Chez la lignée II 19, la synchronisation des mitoses par addition simultanée des facteurs de croissance après une période d'incubation en milieu carencé (fig. 5, courbe

a) est meilleure que ce que l'on obtient dans les mêmes conditions avec la lignée II : le rapport IM max/IM min est voisin de 6,5. Si l'addition de kinétine est différée de 5 h par rapport à celle du 2,4-D (fig. 5, courbe b) ce rapport s'élève jusqu'à 8,5 environ. Lorsque la carence en kinétine est prolongée au-delà de cette valeur optimale (fig. 5, courbe c), on assiste, comme chez la lignée II, à une diminution de la croissance et de la synchronisation. De plus, la position du pic résiduel de synchronisation est retardée par rapport à ce que l'on observe sur les courbes a et b. Dans ces conditions, le facteur auxinique ne détermine plus la position dans le temps de la vague mitotique.

Étude quantitative de la synchronisation

Dans les conditions d'asynchronie, on peut vérifier par l'incorporation de ^{35}S dans les protéines [5] que la croissance est exponentielle. Le temps de doublement des cellules de la lignée II 19 est de 34 h. Cette valeur est égale à l'intervalle qui sépare deux pics de synchronisation successifs (fig. 5). D'autre part, en asynchronie, lorsque la croissance est exponentielle, l'index mitotique est constant (fig. 2-1, courbe a). Dans ces conditions, la surface limitée par la courbe de l'index mitotique, l'axe des abscisses et deux ordonnées séparées d'une durée égale au temps de doublement correspond à une génération nucléaire. En rapportant à cette surface unité la surface de la vague mitotique inscrite dans les 34 premières heures de la croissance, on peut calculer que 70 à 85 % des noyaux se divisent durant cette période. Ces résultats montrent que les vagues de l'index mitotique correspondent à des divisions successives de la majeure partie de la population.

Si l'on admet que la durée de la mitose est constante au cours des expériences, on peut mesurer l'amplitude de la synchronisation par le rapport de la surface du pic

située au-dessus de l'index mitotique moyen à la surface totale de ce pic [2]. Le pourcentage optimal de synchronisation pour la lignée II (fig. 4) est selon ce calcul de 21 %. Il atteint 27 % pour la lignée II 19 (fig. 5).

DISCUSSION

Les expériences décrites montrent que la synchronisation partielle des divisions des cellules de Tabac est obtenue lorsque l'addition des facteurs spécifiques nécessaires à leur croissance est effectuée selon une séquence déterminée. Dans les conditions optimales, le synchronisme des divisions demeure cependant partiel. Il doit exister de nombreuses raisons à l'étalement statistique des vagues mitotiques comme l'indique le fait que la synchronisation s'annule en deux à trois générations [6]. Une autre cause de la limitation quantitative de la synchronisation peut être le fait que la sensibilité des cellules à l'addition d'une cytokinine exogène n'est pas absolue [8] puisqu'on observe en l'absence de ce facteur une croissance de base constante au cours du temps (figs 2, 4). Il faut remarquer, enfin, que la période qui précède le début de la croissance n'est pas assimilable au déroulement normal du cycle mitotique. Elle comporte des événements qui dépendent des conditions expérimentales choisies : les cellules doivent, par exemple, adapter leur métabolisme à l'utilisation du saccharose et conditionner le milieu neuf. Ceci explique que la période de latence qui sépare l'addition des facteurs de croissance du moment de l'apparition des premières mitoses soit maximum lorsque les facteurs sont ajoutés dès le repiquage des cellules en milieu neuf (fig. 1). Les constantes cinétiques définies au cours de ce travail sont donc relatives aux conditions expérimentales utilisées.

La synchronisation des divisions de cellules de végétaux supérieurs peut apparaître spon-

tanément dans des conditions de culture in vitro. Elle a été signalée, par exemple, après la mise en culture de tissus végétaux [1, 14] ou après repiquage en milieu neuf de cellules en phase stationnaire de croissance [10]. Les conditions de l'arrêt de la croissance, avant la mise en culture, doivent être déterminantes dans l'apparition de la synchronisation, mais dans ces exemples, la nature des carences mises en jeu est inconnue. On peut cependant synchroniser la division cellulaire d'une manière contrôlée à la suite de l'inhibition temporaire de la synthèse de l'ADN [3, 7].

La méthode que nous avons décrite nous semble présenter un certain avantage puisque le contrôle de la synchronisation ne met en jeu que la séquence d'addition du facteur auxinique et de la cytokinine indispensables à la division des cellules. Par cette technique, les cellules sont soumises à plusieurs perturbations successives : d'abord une carence en saccharose qui entraîne l'arrêt de la croissance, puis les opérations de mise en culture, éventuellement une carence momentanée en auxine et enfin, une période de culture en l'absence de cytokinine. On peut donc se demander laquelle de ces perturbations détermine la synchronisation observée.

Lorsque les cellules proviennent d'une souche-mère récoltée en phase exponentielle sans avoir subi de limitation en saccharose, la synchronisation est encore réalisée après une carence limitée en cytokinine (fig. 3-2, courbe *a*). D'autre part, les seules opérations de mise en culture et de transfert en milieu neuf perturbent temporairement la croissance sans déterminer, pour autant, de synchronisation mesurable (fig. 3-1). La synchronisation n'étant une conséquence, ni de la carence en saccharose ni de la mise en culture des cellules, doit donc être déterminée postérieurement à ces perturbations. Ceci conduit à admettre que les cellules récoltées en arrêt de croissance ont au début des expériences

une répartition au hasard dans le cycle. Cette situation est vraisemblable puisque les divisions sont asynchrones lorsque les facteurs de croissance sont ajoutés dès le début de la culture (fig. 1). Cependant, dans les courbes d'asynchronie obtenues avec les lignées clonales, il apparaît des fluctuations limitées de l'index mitotique pendant la phase d'initiation de la croissance (fig. 2) [8]. Ces accidents peuvent être une conséquence de la carence en saccharose qui entraîne une répartition préférentielle des cellules dans les phases G1 et G2 du cycle mitotique [12, 13].

Dans certaines expériences, un délai dans l'addition d'auxine a été introduit. On n'a jamais constaté (fig. 2-2, courbe *b* et fig. 3-2, courbe *b*) que l'absence d'auxine ait un effet synchronisant bien que ce facteur soit toujours nécessaire à l'apparition des mitoses. Enfin, si la synchronisation est déterminée par une perturbation quelconque, distincte de la carence en cytokinine, on doit s'attendre à ce qu'elle soit indépendante quantitativement de la durée de cette carence. L'expérience montre (figs 4, 5) que, jusqu'à un optimum au moins, la synchronisation est améliorée lorsque la durée de la carence en cytokinine augmente. L'ensemble de ces faits rend peu vraisemblable l'hypothèse selon laquelle la synchronisation pourrait être déterminée indépendamment de la carence en cytokinine et seulement révélée par l'addition de ce facteur indispensable à la division cellulaire. Il est plus probable qu'il n'y a pas d'autre cause à la synchronisation observée que la carence en cytokinine.

Nous proposons, dans ce qui suit, un modèle hypothétique qui rend compte de l'ensemble de nos expériences. Lorsque les cellules sont ensemencées en milieu neuf carencé en facteurs de croissance, le déroulement complet du cycle mitotique n'est pas possible puisque l'on n'observe, dans ces conditions, que peu

ou pas de mitoses (fig. 1). Il semble cependant que certaines étapes du cycle soient lentement parcourues jusqu'à un ou plusieurs événements incompatibles avec la carence en facteurs de croissance. Les cellules peuvent donc s'accumuler contre ce ou ces blocages. Lorsque la division cellulaire est à nouveau rendue possible par l'addition d'un facteur auxinique et d'une cytokinine, c'est une population non uniforme qui est susceptible de se diviser et on observe une certaine synchronisation des mitoses (fig. 1). Le même résultat est obtenu après une carence limitée en cytokinine seule (fig. 2-2, courbe *a* et fig. 3-2, courbe *a*) : on peut en conclure que c'est la cytokinine qui lève ce ou ces blocages. On ignore s'il existe un ou plusieurs points d'arrêt dus à l'absence de cytokinine mais l'apparition de la synchronisation implique que, si l'effet est multiple, les blocages spécifiques doivent être rapprochés dans le temps. Ceci conduit à penser que la carence en cytokinine perturbe préférentiellement une étape déterminée du cycle mitotique.

Le rôle de l'auxine dans l'induction de la division ne peut être assimilé au contrôle spécifique d'une étape unique du cycle. Il n'est pas possible cependant de savoir si ce facteur a un effet général en permettant le déroulement normal de l'ensemble des événements du cycle ou s'il agit d'une manière discrète sur plusieurs étapes distinctes.

Comme on peut s'y attendre dans l'hypothèse d'une accumulation des cellules dans un état antérieur au blocage dû à l'absence de cytokinine, le maintien prolongé de cette carence entraîne une amélioration de la synchronisation (fig. 4). Ce blocage ne peut cependant être maintenu au-delà d'une certaine durée optimale : lorsque le délai d'addition de la cytokinine est prolongé, on observe une diminution du nombre des mitoses (figs 4, 5) et un retard dans la position de la vague mitotique (fig. 5). Ceci conduit à pen-

ser que l'addition de cytokinine est à l'origine d'une série de phénomènes dont l'expression, la mitose, demande un certain délai. Pour mesurer ce délai, l'auxine doit être ajoutée suffisamment à l'avance (fig. 5). Dans le cas contraire (tableau 2), les positions dans le temps du début de la croissance et de la vague mitotique, lorsqu'elle existe, sont fixées par le moment de l'addition du facteur auxinique. Ce signal déclenche donc un horaire déterminé qui conduit les cellules à se diviser après un délai plus long que celui qui est nécessaire à l'expression de l'effet de la cytokinine. Au cours de ce délai, on peut dans certaines limites, retarder l'addition de cytokinine par rapport à l'addition d'auxine sans modifier la position de la vague mitotique (figs 4, 5). La séquence expérimentale optimale doit permettre qu'il y ait synchronisme entre les horaires indépendamment déterminés par les deux signaux inducteurs de la division cellulaire.

L'intérêt de cette interprétation est qu'elle conduit à attribuer aux cytokinines un rôle spécifique dans le contrôle d'une étape déterminée du cycle mitotique. Nos expériences ne permettent cependant pas de dire que l'effet des cytokinines est direct. L'effet observé sur la synchronisation peut aussi être le résultat d'une séquence d'événements moléculaires dont les cytokinines sont un effecteur quelconque. Nous ignorons, d'autre part, la position dans le cycle mitotique du blocage consécutif à la carence en cytokinine. La méthode que nous venons de décrire doit permettre de préciser à la fois la position

de ce blocage dans les phases G₁, S ou G₂ du cycle mitotique et le rôle métabolique des cytokinines dans le contrôle de la division cellulaire.

Je remercie M. C. Péaud-Lenoël pour les conseils et l'intérêt constant qu'il a portés à ce travail et Mlle A. Chevalier pour sa participation technique aux expériences décrites.

Ce travail a bénéficié de l'aide matérielle de la Recherche Coopérative sur Programme no. 142 du Centre National de la Recherche Scientifique.

REFERENCES

1. Adamson, D, Low, V H K & Adamson, H, Biochemistry and physiology of plant growth substances (ed F Wightman & G Setterfield) p. 505. The Runge Press Ltd, Ottawa (1968).
2. Engelberg, J, Synchrony in cell division and growth (ed E Zeuthen) p. 497. Interscience-Wiley, New York, London, Sydney (1964).
3. Eriksson, T, *Physiol plant* 19 (1966) 900.
4. Jouanneau, J P, *Physiol plant* 23 (1970) 232.
5. Jouanneau, J P & Péaud-Lenoël, C, *Physiol plant* 20 (1967) 834.
6. Jouanneau, J P & Teyssendier de la Serve, B, *Compt rend acad sci Paris* 270 (1970) 320.
7. Mattingly, E, *Exptl cell res* 42 (1966) 274.
8. Péaud-Lenoël, C & Jouanneau, J P, Contrôle du cycle mitotique dans les suspensions de cellules de Tabac cultivées en milieu liquide. Conférence internationale sur les cultures de tissus de plantes (ed Centre National de la Recherche Scientifique, Paris). Sous presse.
9. Sharma, A K & Sharma, A, Chromosome techniques. Theory and practice. Butterworths, London (1964).
10. Street, H E, Les cultures de tissus de plantes (ed Centre National de la Recherche Scientifique, Paris) p. 177. (1968).
11. Tandeau de Marsac, N. Résultats non publiés.
12. Van't Hof, J, *Am j bot* 53 (1966) 970.
13. Webster, P L & Van't Hof, J, *Exptl cell res* 55 (1969) 88.
14. Yeoman, M M & Evans, P K, *Ann bot* 31 (1967) 323.

Reçu le 11 janvier, 1971

Version revue reçue le 29 mars, 1971

